

근권미생물과 토양병방제  
- 유용길항균이 인삼근부병원에 미치는 영향 -

김성일 · 이민웅\*  
동국대학교 농생물학과

Establishment of rhizosphere microbes for plant protection on  
soil-borne diseases

- Beneficial antagonist and its mode of action toward  
ginseng root rot pathogen -

S. I. Kim and M. W. Lee\*

Department of agrobiolgy, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

**ABSTRACT:** From soil samples, 380 antagonistic microorganisms were isolated. Among the isolates, 42 strains had mycelia growing inhibition ability against *Fusarium solani*, ginseng root rot causing pathogen. Isolates CHA 1 and S-PFHR 6 were proposed as antagonists for this study and they were identified as *Promicromonospora* sp. and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* respectively. As an antagonism against hyphae of *F. solani* in dual culture test, CHA 1 and S-PFHR 6 inhibited linear growing, caused abnormal branching, and the membrane projection which formed by cell wall destruction. The secondary metabolites contained in the culture filtrates which prepared from PD broth and Nutrient broth inhibited the spore germination to 14.3%. The culture filtrate of S-PFHR 6 which prepared by a little amount of soil extract addition to nutrient rich medium had more strongly inhibited the spore germination and spore germination decreased to less than 4.0% in it. The soil used in this study had fungistasis and the germination rate of macroconidia and chlamyospore of *F. solani* was 19.4% and 17.7% respectively. The steam sterilized soil lost fungistasis and germination rate of conidia increased to more than 97.9%. The soils amended with the propagule of CHA 1 and S-PFHR 6 increased fungistasis and the germination rate of macroconidia decreased to 14.7% and 11.7% respectively in each treatments. But the soil amended with glucose and asparagine annulled fungistatic ability and the germination rate of macroconidia increased to more than 48.0%. As an antagonistic activity of the secondary metabolites of two antagonistic isolates in soil, the germination rate of macroconidia of *F. solani* was 9.3% in the soil amended with the culture filtrate of CHA 1 but the culture filtrate of S-PFHR 6 had no such activity. In the soil which treated with antagonist propagule or culture filtrate, the chlamyospore germination rate was lower than that in natural soil. The addition of glucose and asparagine to antagonist propagule treated soil did not enhanced the chlamyospore germination.

**KEYWORDS:** Antagonistic microorganism, *Fusarium solani*, *Promicromonospora* sp., *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, fungistasis, secondary metabolite.

서 론

*Fusarium solani*는 인삼(*Panax ginseng*) 재배지

토양에서 인삼근부병을 일으키는 중요한 병원균 중의 하나로(Kim and Lee, 1974), 인삼의 생산량을 감소시킬 뿐만 아니라 재그루시 발생하는 연작장해의 가장 큰 요인으로 작용하여 이 균에 대한 방제법의 개발은 중요하다.

\*Corresponding author

인삼의 토양병 방제에 관한 연구로는 농약을 토양에 관주하거나(Choi and Chung, 1971; Lee *et al.*, 1985; 柳와 吳, 1985; Yu, 1987), 훈증처리(Whetzel and Rosenbaum, 1912; Whetzel *et al.*, 1916; 安 등, 1982)하여 토양을 살균함으로써 병 발생을 방제하거나, 개량재 처리로 토성을 개량하여 토양 내 유용균의 성장을 촉진함으로써 병 발생을 방제하는 방법(Chung and Kim, 1978; Papavizas, 1975; Son *et al.*, 1985) 등이 보고되어 있다. 최근에는 농약에서 문제시되는 공해나 잔류독성에 대한 위험성이 적은 방제법으로 길항미생물을 이용한 생물학적 방제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며(Chung *et al.*, 1981; 심, 1989; Yu, 1987), 특히 토양 미생물 중 근권부위나 근면에 정착하여 식물이 분비하는 영양소에 대해 병원균과 경쟁관계에 있거나(Elad and Baker, 1985; Elad and Chet, 1987), 병원균에 유해한 항생물질을 생산하여 토양에 분비함으로써 토양의 정균작용을 유도하여 토양병의 발생을 억제하거나(Oedjijono *et al.*, 1993; Brisbane and Rovira, 1988, Howell and Stipanovic, 1980; Parker *et al.*, 1984), 병원균에 기생하여 섭식하는 능력이 있는 균(Barnett, 1963; Boosalis, 1964; Sneh *et al.*, 1977) 들을 주로 연구 대상으로 하고 있다. 생물학적 방제에 이용 가능한 길항미생물들은 세균, 방선균, 진균 등 그 수나 종류가 다양하며(Sneh *et al.*, 1977), 식물 근권에 쉽게 정착하여 식물의 성장을 증진시키는 근권 세균들이 특히 토양병 방제에 효과가 있다고 하였다(Davidson, 1988; Kloepper, 1983).

이에 본 연구에서는 인삼 근부병원체인 *F. solani*에 대해 방제효과가 있는 길항미생물을 토양으로부터 선별하고, 이들이 나타내는 병 방제 작용을 조사하여 *F. solani*에 의한 인삼근부병의 발생 예방과 방제에 관한 실용화 방안을 모색하고자 실험에 임하였다.

## 재료 및 방법

### 길항미생물의 분리

토양시료는 강원도 오대산과 경기도 포천의 인삼포를 중심으로 선정지역의 표토부를 긁어내고 토심 20 cm 이내의 흙을 1 kg 정도 채집하여 미생물 분리 토양으로 사용하였다. 채집된 토양은 구경 2 mm의

체로 쳐서 통과된 토양을 멸균수에 10배수로 연속 희석하여 10,000배로 희석한 다음 각각의 분리 배지에 0.1 ml씩 접종하였다(Lee *et al.*, 1985). 세균 분리배지는 Nutrient agar배지(Difco Co.)와 King 등(1954)의 KB배지 그리고 *Bacillus* spp.는 Wiley(1962)의 방법에 준하여 시료 토양 10 g을 90 ml 멸균수에 넣고 10분간 끓인 후 실내에 24시간 방치하여 표면에 형성된 피막을 nutrient agar 평판 배지에 도말접종하여 분리하였다. 방선균 분리배지는 Hsu와 Lockwood(1975)의 Chitin 배지를 사용하였다. 접종된 평판배지는 28°C 항온배양기에 세균은 3일, 방선균은 7일간 배양하여 집락의 성장형태에 따라 균을 분리하였으며, 특히 방선균 배지에서 자란 균들은 Chitin 분해능이 있는 균들만을 선별하여 분리하였다.

분리한 균주들 중 공시 병원균 *F. solani*에 대해 길항력이 있는 균주들을 선별하기 위해 PDA 평판 배지에 *F. solani*를 접종하여 3일간 예비배양한 다음 집락의 가장자리에서 내경 5 mm의 cork borer로 균체를 배지와 함께 채취하여 새로운 PDA 평판배지의 중앙에 옮겨 접종하고 페트리접시 가장자리로부터 1 cm 떨어진 위치 4곳에 분리균을 접종하여 5일간 대치배양한 뒤에 형성되는 저지대의 거리를 mm 단위로 측정하여 각 분리균주들의 길항력을 판정하였다(Fig 1A). 대치배양시 길항작용에 의한 *F. solani* 균사의 이상생장은 Lifshitz 등(1986)의 방법을 참고로 혐축반응 부위의 균총을 떼어 내어 광학현미경( $\times 400$ )으로 확인하였다.

### 길항균의 동정

*F. solani*에 대해 길항력이 크게 확인된 CHA 1과 S-PFHR 6 두 균주를 길항균주로 공시하였다. CHA 1은 배지상에서의 성장특성을 조사하기 위해 International Streptomyces Project(ISP)의 공시배지에 접종하여 28°C 항온배양기에서 15일 동안 배양한 후 각 배지 상에서의 성장상태, 공중균사의 성장 유무, 집락의 색깔 등을 조사하였다. 균사의 구조와 포자의 형성 유무를 관찰하기 위해 Oat meal agar 평판배지에 접종하여 15일간 28°C 항온배양기에서 배양한 다음 집락을 배양배지와 함께 오려내 2% glutaraldehyde(0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3)에 담궈 4°C 냉장고에서 2시간 동안 고정시

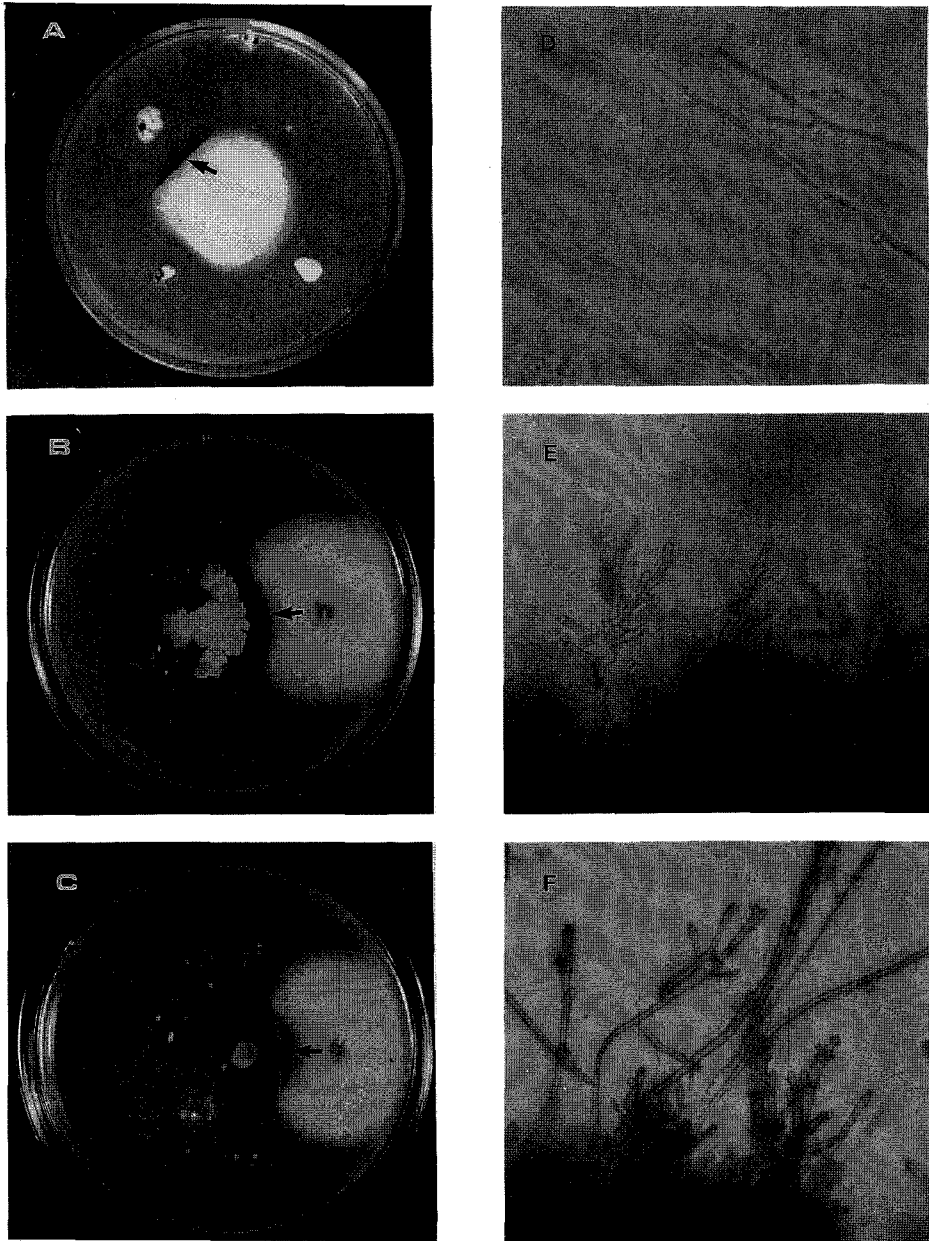


Fig. 1. Petri-plate assay for antifungal activity. (A) Growth inhibition of *F. solani* by antagonistic isolates, (B, C) Color production in *F. solani* colony affected by S-PFHR 6 and CHA 1, (D) Normal hyphal tip of *F. solani*, (E, F) Hyphal tip swelling and abnormal mycelium branching.

키고, 1% Osmium tetroxide(0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3)에 담귀 4°C 냉장고에서 2시간 동안 마지막 고정을 시킨 다음 70, 85, 90, 95, 99%의 메탄올에 각각 40분간씩 탈수시킨다. 탈수된 시료는 금으로 coating시키고 주사전자현미경(Hitachi Co.)

으로 관찰하였다. S-PFHR 6의 형태적 특성을 조사하기 위해 24시간 배양한 후 Gram 염색하고, 내생포자는 Dorner의 방법(Benson, 1990)으로 Carbol fuchsin으로 염색 후 1,000배 immersion 광학현미경으로 관찰하였다. 액체배지에서 12시간 배양한 후

멸균수에 균을 현탁하여 400배 현미경하에서 운동형태를 확인하였다. 생화학적 성상은 Gerhardt 등 (1981)의 지침을 참고로 Nitrate reductase, Catalase, Oxidase, Arginine dihydrolase, Esculin hydrolysis, Gelatin liquidification, Urease,  $\beta$ -galactosidase,  $H_2S$  production, V-P test, O/F test, Citrate utilization 등을 조사하였으며, 탄수화물 이용성은 Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, Maltose, Malate, Adipate, Arabinose등에 대해 조사하였다. CHA 1과 S-PFHR 6 두 균주의 배양, 형태적 특성을 참고하여 Bergey's 분류지침(Buchanan and Gibbon, 1974)에 따라 동정하였다.

#### F. solani의 대형포자 및 후막포자의 준비

대형포자는 *F. solani*를 PDA 사면배지에 접종하여 28°C 항온배양기에서 7일간 배양한 후 4°C 멸균수로 수확하였다. Allen(1957)의 방법에 따라 준비한 토양침출액배지(Glucose 1.0 g;  $K_2HPO_4$ , 0.5 g; soil extract, 100 ml; D.W., 900 ml; pH 6.8)에 혈구계산기를 이용하여 배지 1 ml당  $10^6$ 개의 농도로 대형포자 부유액을 만들고 왕복진탕배양기(28°C, 120 rpm)에서 4주간 배양하여 후막포자를 유도하였다. 수확한 포자는 멸균수로 3회 세척하여 실험에 사용하였다.

#### 배지 조성에 따른 항균물질 생산능 조사

PD broth와 Nutrient broth 그리고 토양을 멸균수에 넣고 끓인 후 여과지로 거른 soil extract(Allen, 1957)등 3가지 액체배지와 이들 배지들을 각각 같은 부피비로 섞어 배양배지로 준비하고 준비된 배양배지는 100 ml 삼각플라스크에 20 ml씩 분주하였다. 두 공시균주는 nutrient broth에 배양하여 멸균수로 3회 원심분리세척(12,000 g, 8분)하여 균을 수확한 후 준비된 각 배양배지에 S-PFHR 6는  $10^{12}$  cells/ml, CHA 1은 균사체를 마쇄하여 10  $\mu$ g/20 ml씩 접종하여 왕복진탕기에서 각각 3일, 5일간씩 배양하고 millipore membrane(0.45  $\mu$ m)으로 걸러 무균적으로 배양여과액을 준비하였다.

배양여과액은 세포배양용기(Costar Co. Cambridge, MA 02140, USA)에 1.5 ml씩 분주하고, 준비된 *F. solani*의 대형포자를 1×1 cm 크기로 자른 membrane filter에 100-200개씩 접종한 후(Sneh and Lockwood, 1976) 각 배양여과액 표면에 띄워 24시간

배양하고 꺼낸 다음 Rose bengal 염색액으로 4시간 염색하였다(Hsu and Lockwood, 1973). 발아관이 포자길이의 1/2 이상 자란 것을 발아한 것으로 판정하여 발아율을 조사하였으며 각 처리구 간의 차이는 각 처리구를 5회 반복·처리한 후 던칸의 다중검정법으로 통계처리하여 비교하였다.

#### 토양 정균현상에 대한 길항균 및 영양원의 영향

산림의 부엽토를 채취하여 2 mm 체로 쳐서 통과된 토양을 자연토양으로 하고, 이 자연토양을 3일에 걸쳐 1시간씩 120°C (1.5 atm)로 고압증기살균한 토양을 멸균토양으로 준비하였다. 길항균의 토양처리를 위해 S-PFHR 6는 nutrient broth에 24시간 배양하여 멸균수로 3회 세척한 후 토양 1 g당  $10^9$  개씩 접종하고, CHA 1은 nutrient broth에 3일간 배양한 후 멸균수로 3회 세척하여 수확한 균체를 millipore membrane(0.45  $\mu$ m)과 진공펌프로 멸균수를 제거한 후 멸균수에 현탁하여 10,000 rpm으로 1분간 마쇄한 후 토양 1 g당 미쇄한 균사체를 1  $\mu$ g씩 접종하였다. 배양여과액은 두 공시균주를 Nutrient broth에 접종하여 항균물질 생성능 조사에서와 같은 방법으로 배양여과액을 준비하여 15 ml/100 g soil 씩 토양에 처리하였다. 영양원 처리구는 Sneh 등 (1984)의 실험결과를 참고하여 glucose와 asparagine을 토양 1 g당 각각 0.8 mg, 0.2 mg씩 길항균체와 동시에 처리하였다. 각 처리구의 최종 수분함량은 15% (v/w)가 되도록 조정하였으며, 각 처리구 토양은 비닐봉투에 넣어 골고루 섞어 주었다. 길항균 균체 처리구와 영양원 처리구는 *F. solani*를 처리하기 3일 전에 준비하여 25°C 항온배양기에서 예비배양하였다(Griffin, 1962).

포자 발아율은 각 처리 토양을 직경 9 cm의 페트리접시에 50 g씩 넣은 다음 대형포자 및 후막포자가 100개 정도씩 접종된 2×2 cm 크기의 membrane filter(Filonow and Lockwood, 1979)를 각 처리 토양이 담긴 페트리접시 중간에 묻어 5일간 배양한 후 membrane filter를 꺼내어 염색액(Hsu and Lockwood, 1973)에 염색한 후 포자 발아율을 조사하였다(Lee et al., 1985).

## 결 과

각 채집지별 재료토양에서 분리한 380개 균주 중

Table 1. Inhibitory effects of microbial antagonists on *F. solani*.

Isolates	Range of inhibition zone(mm)	Isolates	Range of inhibition zone(mm)
CHA 1	11	CHA 37	3
CHA 2	11	CHA 40	10
CHA 3	5	CHA 44	6
CHA 4	6	S-PFHR 6	5
CHA 5	10	R-PFD 4	3
CHA 6	3	S-PFD 1	4
CHA 7	4	S-PFD 6	5
CHA 8	10	R-PFD 7	5
CHA 11	2	S-PFHR 7	4
CHA 14	2	R-PFD 3	2
CHA 17	5	S-PFHH	5
CHA 19	3	S-PFD 2	3
CHA 20	8	S-PFD 3	5
CHA 24	6	S-NAHH 1	5
CHA 25	6	S-NAHD	6
CHA 26	8	S-NADH 5	4
CHA 27	11	S-NAD 4	1
CHA 29	9	S-NAHD	4
CHA 30	4	PD2BA 10	4
CHA 35	10	PD2BA	3
CHA 36	11	PH1BA	2

*Fusarium solani*에 길항력이 있는 분리균주는 42개였으며, PDA 평판배지 상에서의 길항능력을 조사한 결과는 Table 1과 같다. chitin 분해능이 있는 24개 방선균 균주 중 저지원의 길이가 3 mm 이내인 균주는 CHA 6, 11, 14, 19, 37 등이었다. CHA 1, 2, 5, 8, 27, 35, 36, 40등은 저지원의 길이가 10 mm 이상이었으며, 저지원 부위의 *F. solani* 균사에 진한 암갈색의 ethanol로 추출 가능한 색소를 형성하게 하였다(Fig. 1C). KB 배지에서 분리된 10개의 길항균 중 S-PFHR 6, S-PFD 6, R-PFD 7, S-PFHH 및 S-PFD 3 등 5개 균주가 5 mm 이상 저지원을 형성하여 길항능력이 크게 나타났으며, Nutrient 배지에서 분리된 균주 중 4균주 S-NAHH 1, S-NAHD, S-NADH 5, S-NAHD 등이 큰 길항능력을 나타내었다. 또한 *Bacillus* spp. 분리법에 따라 분리된 길항균주는 3개이고 이 중 PD2BA 10이 가장 길항능력이 컸다. 이들 길항성 세균류들은 방선균류에 비해 저지원

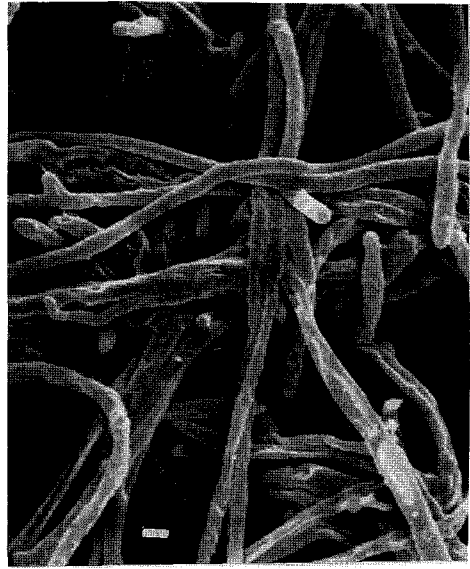
형성거리가 짧고, 저지원 부위의 *F. solani* 균사는 진한 녹색의 색소를 생성하였다(Fig. 1C). 각 길항균주들의 영향을 받은 *F. solani* 균사는 길항균의 종류에 관계없이 모두 균사의 끝 부분의 길이생장이 억제되고, 정상적인 성장을 하는 균사보다 뭉뚱해지며, 비정상적인 분지현상을 나타내었다(Fig. 1D, E, F).

길항능력이 큰 분리균주 CHA 1의 균사생장 및 배지상의 성장형태를 조사한 결과 공중균사의 발달이 거의 관찰되지 않는 호기성 방선균으로서 그람 양성균이었다. 균사는 분절되어 다양한 형태의 비운동성 포자를 형성하고, 과산화수소에 침적하면 기포가 발생되며, 세포벽은 galactose를 포함하지 않는 type VI에 속하였다(Table 2). 전자현미경 관찰시 포자가 관찰되지 않았고, 균사표면이 매끄러운 균으로 *Promicromonospora* sp.와 가장 유사한 종류로 동정되었다(Fig. 2). 세균 S-PFHR 6은 그람음성의

**Table 2.** Morphological and biochemical characteristics of CHA 1.

Aerial mycelium	-
Gram stain	+
Hyphae diameter 1.2~1.4 $\mu$ m	
Conidia on conidiophore	-
Major constituents of cell wall:	
meso-DAP	+
Arabinose	+
Galactose	-
Hydrolysis of:	
casein	+
tyrosin	+
gelatin	+
starch	+
cellulose	-
hypoxantin	-
Enzyme activity:	
phosphatase	+
galactosidase	+
catalase	+
oxidase	+
nitrate reductase	-
Acid production from:	
mannitol	+
melibiose	+
raffinose	+
rhamnose	+

운동성 간균으로 Carbol fucsin으로 염색하면 세포는 타원형으로 변형되고 세포 내에 축적된 PHB (Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate)가 내생포자와 비슷하게 염색된다. KB 배지에서 형광물질을 생산하지 않고, glucose가 결핍된 상태에서도 생장이 이루어지는 균으로서 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*와 가장 유사한 종으로 동정되었다(Table 3). Nutrient broth와 PD broth 배지 그리고 이 두 배지를 같은 비율로 섞은 배지에서 공기균주는 모두 생장이 양호하였으며, 균체를 제거한 배양여과액에서의 *F. solani* 포자 발아율은 12.3% 이하로 낮았다. 토양침출액이나 두 영양배지에 토양침출액을 같은 비율로 섞어 준비한 배양여과액에서의 발아율은 85.7% 이상 높은 발아율을 보였다(Table 4, 5). CHA 1의 경우 영양

**Fig. 2.** Scanning electron microscopy of *Promicromonospora* sp. cultured on oat meal agar plate. (bar, 1  $\mu$ m).

배지에 소량의 토양침출액을 첨가한 배양여과액은 89.0%의 높은 발아율을 보인 반면 S-PFHR 6은 토양침출액을 첨가한 배양여과액은 *F. solani* 포자 발아율을 4.0% 이하로 억제하였다(Table 5). 실험에 사용된 토양은 *F. solani*에 대해 정균능력이 있는 토양으로 *F. solani*의 포자는 토양내에서 19.4%의 낮은 발아율을 보였으나 고압증기살균하면 발아율은 87.5%로 증가하였으며 Fig. 3의 A와 같이 멸균된 토양에서 대형포자의 발아는 정상적으로 진행되었다. 길항균의 토양처리 효과로 CHA 1과 S-PFHR 6 두 균주의 균체를 처리한 처리구에서 *F. solani*의 포자 발아율은 각각 13.0%, 9.7%로 감소하였다. 배양배지에 생산된 항균물질들의 토양정균작용에 대한 효과로 배양여과액을 토양에 처리하면 CHA 1의 배양여과액은 토양의 정균작용을 증대시켜 포자 발아율이 9.3%로 감소하였으나 S-PFHR 6의 배양여과액 처리구의 포자발아율은 29.0%로 오히려 토양 정균작용을 감소시켰다. 토양내 영양경쟁관계로 glucose와 asparagine을 첨가해 준비한 토양에 CHA 1 균체를 처리한 토양에서의 *F. solani*의 포자발아율은 82.7%로 발아율이 높았으나 S-PFHR 6 처리구에서의 발아율은 32.0%로 CHA 1을 처리한 토양보다 높은 영양경쟁관련이 있었다(Table 6). *F. so-*

**Table 3.** Morphological and biochemical characteristics of S-PFHR 6.

Cell type	Rod
Cell size(μm)	0.8×2.0-2.5
Gram stain	-
Motility	+
Yellow pigment in cell	-
Endospore	-
Nitrate reductase	+
Catalase	+
Oxidase	+
Arginine dihydrolase	+
Esculin hydrolysis	-
Gelatin liquidification	+
Urease	-
β-galactosidase	-
H <sub>2</sub> S production	-
V-P test	-
O/F test	inert
Citrate utilization	+
Carbon utilization	
Glucose	-
Arabinose	-
Mannose	-
Mannitol	+
Maltose	+
Malate	+
Adipate	-
Acid from	
Glucose	-
Mannose	-
Rhamnose	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Sucrose	-
Arabinose	-
PHB	+

*lani* 후막포자의 경우 자연토양에서 17.7%, 멸균토양에서 79.7%의 발아율을 보여 Fig. 3의 B와 같이 멸균토양에서 후막포자는 정상적으로 발아하여 성장하며 성장한 균사의 끝 부위에 새로운 후막포자가 생성되었다. 길항균 균체나 길항균이 생산한 항균 물질을 처리하면 포자의 발아율은 크게 감소하고

**Table 4.** Effect of culture filtrates of CHA 1 on the spore germination of *F. solani*.

Media	% of germination
Potato dextrose broth	12.3± 2.43 <sup>b</sup>
Nutrient broth	5.0± 1.27 <sup>a</sup>
Soil extract	89.0± 7.42 <sup>c</sup>
Potato dextrose broth+soil extract	87.6± 10.27 <sup>c</sup>
Nutrient broth+soil extract	87.6± 9.33 <sup>c</sup>
Potato dextrose broth+Nutrient broth	14.3± 3.73 <sup>b</sup>
Potato dextrose+Nutrient broth + soil extract	89.0± 9.27 <sup>c</sup>

The different letters indicate a significant difference (P=0.01) according to Duncan's new multiple range test.

**Table 5.** Effect of culture filtrates of S-PFHR 6 on the spore germination of *F. solani*.

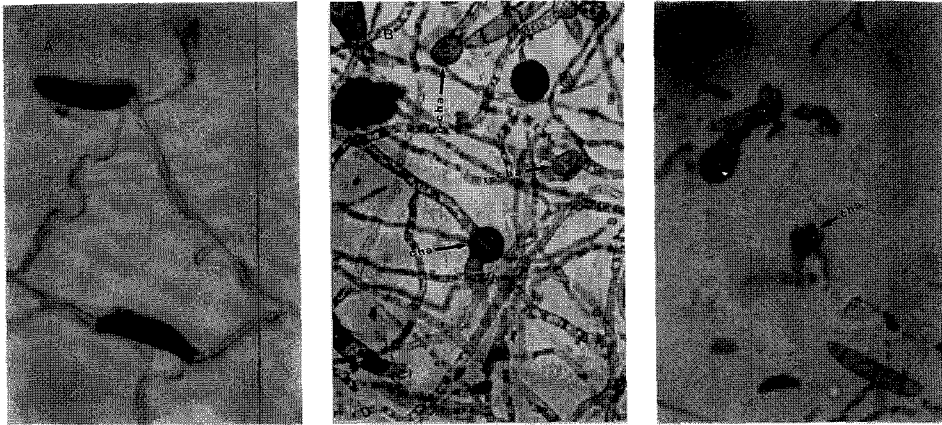
Media	% of germination
Potato dextrose broth	6.0± 2.43 <sup>a</sup>
Nutrient broth	5.7± 1.73 <sup>a</sup>
Soil extract	91.0± 12.43 <sup>b</sup>
Potato dextrose broth+soil extract	85.7± 14.33 <sup>b</sup>
Nutrient broth+soil extract	86.7± 10.17 <sup>b</sup>
Potato dextrose broth+Nutrient broth	5.0± 2.42 <sup>a</sup>
Potato dextrose broth+Nutrient broth + soil extract	4.0± 3.50 <sup>a</sup>

The different letters indicate a significant difference (P=0.01) according to Duncan's new multiple range test.

이러한 발아억제효과는 영양원을 첨가해 주어도 감소하지 않았을 뿐만 아니라(Table 7) 배양기간이 길어지면 Fig. 3의 C와 같이 균사와 후막포자의 분해 현상이 관찰되었다.

## 고 찰

채집토양을 4종의 선택배지에 배양하여 분리한 균주들의 길항작용을 조사한 결과 공시한 모든 선택배지에서 길항균이 분리되었으며, 같은 배지에서 분리한 균주들의 집락성장형태가 다른 것으로 보아 (Table 1), Sneh 등(1977)이 자연토양에서 *Phytophthora* spp.와 *Pythium* spp. 그리고 *Aphanomyces eu-*



**Fig. 3.** Growth feature of spores of *F. solani* in various soil conditions. (A) Normal germination of macroconidia in steam sterilized soil. (B) Normal germination of chlamydospore(cha) and reproduced chlamydospore (r-cha) on hyphal tip in steam sterilized soil. (C) Destructed chlamydospore(cha) and mycelium(my) in antagonist inoculated soil.

**Table 6.** Germination of macroconidia of *F. solani* in soils supplemented with different source of ammendments.

Soil condition	% of germination
Antagonist: CHA 1	
Natural soil+propagule	13.0± 5.76 <sup>a</sup>
Natural soil+Culture filtrate	9.3± 3.23 <sup>a</sup>
Natural soil+propagule +Nutrient solution	82.7± 17.92 <sup>c</sup>
Antagonist: S-PFHR 6	
Natural soil+propagule	9.7± 3.67 <sup>a</sup>
Natural soil+Culture filtrate	29.0± 8.63 <sup>b</sup>
Natural soil+propagule +Nutrient solution	32.0± 11.23 <sup>b</sup>
Natural soil	19.4± 7.26 <sup>ab</sup>
Sterillized soil	87.5± 19.27 <sup>c</sup>

The different letters indicate a significant difference at P=0.05, according to Duncan's nuw multiple range test.

*teiches*의 휴면기관이나 유주자에 기생하는 미생물 들로서 Oomycetes, Chytridiomycetes, Hyphomycetes, 방선균 및 세균 등을 분류하였다고 보고한 것과 같이 토양 내에 *F. solani*에 대해 길항능력이 있는 균의 종류도 다양함을 알 수 있다. 본 실험에 공시된 균주 CHA 1과 S-PFHR 6의 형태적, 배양학적 그리고 생리생화학적 특성을 참고로 Buchanan과 Gib-

**Table 7.** Germination of chlamydospores of *F. solani* in soils supplemented with different source of ammendments.

Soil condition	% of germination
Antagonist: CHA 1	
Natural soil+propagule	5.7± 2.23 <sup>b</sup>
Natural soil+Culture filtrate	11.3± 1.43 <sup>bc</sup>
Natural soil+propagule +Nutrient solution	9.3± 3.92 <sup>b</sup>
Antagonist: S-PFHR 6	
Natural soil+propagule	6.3± 2.73 <sup>b</sup>
Natural soil+Culture filtrate	1.7± 1.47 <sup>a</sup>
Natural soil+propagule +Nutrient solution	10.3± 5.72 <sup>bc</sup>
Natural soil	17.7± 6.37 <sup>d</sup>
Sterillized soil	79.7± 12.63 <sup>e</sup>

The different letters indicate a significant difference at P=0.05, according to Duncan's nuw multiple range test.

bons(1974) 및 Unmalai와 Gnanamanickan(1984)의 분류체계에 의해 각각 동정한 결과 공시균주 CHA 1은 *Promicromonospora* sp.로 동정되고, S-PFHR 6은 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*로 동정되었다. 이 두 균주의 길항력은 Kim 등(1992)이 보고한 길항균 *Trichoderma* spp.에 비해 평판배지상에서의 세포외



대사산물에 의한 생장억제 거리가 넓었으나 현미경상의 균사생장 억제기작은 유사하였다. 즉, Lifshitz등(1986)이 *Trichoderma* spp.를 완두종자에 처리하여 입고병에 관한 생물학적 방제기작을 연구한 결과 *Trichoderma* spp.가 *Pythium* spp.과 접촉되면 두 병원균의 균사체 내에 액포 발달이 현저하여지고 세포내 원형질의 응고 현상과 같은 것이 관찰되며, 배양기간이 길어지면 균사의 부풀음 증상이 나타난다고 하였는데 CHA 1과 S-PFHR 6에 의한 *F. solani*의 균사생장억제 형태를 보면 비정상적인 균사의 분지 상태를 관찰할 수 있고 또한 부풀음 증상이 생기는 것으로 보아 이는 길항균배양액에 있는 항생물질에 의한 생장저해(McKean *et al.*, 1986; Morgan, 1963)나 Chitinase와 같은 효소의 작용에 의해 균사에 손상이 일어나는 초기단계라고 보여진다(Fig. 1E, F). Ferreira등(1991)은 길항균 토양처리에서 *Eutypa lata*의 포자 발아력을 조사한 결과 *Bacillus subtilis*를 처리하면 균사생장의 91.4%의 억제효과가 있고 포자발아는 100% 억제된다고 하였다. 이런 현상을 Ferreira등(1991)은 *E. lata*의 포자가 72시간 동안 *B. subtilis*에 접촉되면 항생물질이 생겨 포자 발아가 안되고 정균현상이 유도된다고 하였다. 공기균주들의 배양여과액이 병원균 포자발아에 미치는 영향을 조사한 결과, S-PFHR 6와 CHA 1 두 균주는 PD broth나 nutrient broth 그리고 두 배지를 같은 비율로 섞어준 배지에서 생장이 양호하였고, 배양여과액은 *F. solani*의 포자발아를 크게 억제시켜 12.3% 이하의 발아율을 나타내었다. 토양침출액이나 PD broth와 nutrient broth 배지에 토양침출액을 첨가하여 준비한 배지에서는 두 길항균의 생장이 약해지고 그들의 배양여과액도 포자발아억제율이 낮은 것으로 보아 길항물질의 생산은 길항균의 생장과 밀접한 관계가 있으며, 특히 두 영양배지에 토양침출액을 소량 첨가한 CHA 1 배양여과액에서 *F. solani* 포자의 발아율이 89.0%로 항균물질을 생산하지 않았으나, 같은 조건의 배지에서 S-PFHR 6 배양여과액은 4.0%의 낮은 발아율을 나타낸 것으로 보아 S-PFHR 6은 토양내에 존재하는 무기물의 영향으로 대사산물의 항균활성이 증대된 것으로 예상된다. 토양에 서식하는 많은 미생물 중에는 생물학적 방제재로서의 가치가 있고, 미생물을 이용한 식물병 방제의 시도 또한 다방면으로 연구되어(Burr and

Caesar, 1984; Schroth *et al.*, 1984)왔다. 특히 세 균류를 이용한 방제효과가 광범위하게 연구보고(Vidaver *et al.*, 1972; Xu and Gross, 1986)되고 있으며, 그 중 *Bacillus* spp.와 *Pseudomonas* spp.에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Thomashow 등(1990)은 이 균들을 포장에 처리한 결과 방제효과가 있다고 하였다. 이들 길항미생물을 이용한 식물병 방제법으로 식물의 종자표면이나 식물근권에 접종하여 식물생장을 촉진(PGBR: Plant Growing Promoting Rhizobacteria. Davidson.1988, Kloepper, 1983)시키는 방법, 종자표면 도포로 종자 발아촉진(EPR: Emergence Promoting Rhizobacteria. Gross. 1985, Kloepper. 1983)시키는 방법, 토양에 길항균을 접종하여 병원균발아를 억제시키는 정균현상유도(Fillo-nov *et al.*, 1983)하는 방법등이 시도되고 있는데 이러한 시도의 이유 중의 하나는 처리한 길항미생물들이 분비하는 항생물질이 식물체 표면의 병원균생장을 억제 또는 포자발아를 크게 감소시키기 때문이라고 하였다(Howell and Stipanovic, 1980; Lee *et al.*, 1985; Lockwood, 1977).

정균현상을 나타내는 자연토양에 각 길항균들의 균체를 접종, 처리하면 모든 처리구에서 정균현상은 더욱 증가되고 이러한 정균현상 증대 효과는 *F. solani*의 포자의 종류에 관계없이 차이가 없었다(Table 5, 6). 대형포자의 경우 멸균토양에서 87.5% 정도의 높은 발아율을 보이고, 자연토양에 배양여과액을 처리하거나, 자연토양에 영양원을 첨가하면 병원균의 발아율은 자연토양에서의 발아율보다 증가하지만 배양여과액 처리구의 발아율이 영양원 처리구의 발아율보다 낮은 것으로 보아 길항균들의 토양내 길항작용은 영양경쟁 관계가 큰 것이라고 보여지며(Table 5), 후막포자는 대형포자와 달리 살균토양에서는 일반적으로 79.7% 포자발아가 관찰되었으나 영양물질인 glucose와 asparagine을 처리한 처리구에서도 15% 이하의 포자발아력을 나타낸 것으로 보아 후막포자의 발아는 정균현상에 민감한 반응을 보이고, 후막포자의 발아에는 많은 양의 영양물질이 첨가되어야 정균현상이 해소(Lockwood, 1977)되는 것으로 보인다. 자연토양에서의 발아율이 17.7%인 것에 비해 길항균 처리구, 배양여과액 처리구 및 영양물질 처리구에서 포자발아율이 낮은 것은 Lingapa와 Lockwood(1964)가 지적한 바와 같

은 억제현상이라고 보여진다(Lee *et al.*, 1985). 또한 Ko와 Lockwood(1967)는 자연토양에서 대부분의 진균류의 포자발아가 억제된다는 것은 일반적으로 에너지 생산단계와 관련되는 영양분 물질의 고갈에 의한다고 하였고, 또한 이를 증명하기 위해 인위적으로 양분 고갈 상태를 유도한 모델 시험장치 실험에서도 이 같은 현상이 있음을 확인하여 포자발아가 양분과 밀접한 관련이 있다고 하였다(Filonow *et al.*, 1983; Ko & Lockwood, 1967; Heo *et al.*, 1987).

이외 토양내에서 균의 생존력에 관해 균핵을 형성하는 균주는 균핵 외부를 둘러싸는 환경으로부터 수분에 함유된 영양물질이 유입되기도 하고, 수분을 매개로 균핵이 다량의 양분을 손실하는 수도 있다고 하였다. 이때 균핵이 분비한 물질을 영양원으로 이용하는 세균과 기타 미생물들이 균핵을 침입하므로서 균핵은 손상을 받게 된다고 하였다(Gladders, 1976). 따라서 포자발아 억제 및 균사생장의 저해는 토양내 미생물 간의 일차적인 영양경쟁에 의한 것으로 보이며, 이차적으로는 각 미생물이 근권 내에 생존하면서 활성화 단계에서 분비하는 대사산물 중 길항성을 띄는 종류가 있는데 이러한 길항성 대사산물의 작용성에는 양분 또는 무기환경조건이 크게 영향을 미치는 것으로 보인다. 근부병방제를 효과적으로 이루기 위해서는 유용 길항균의 활성 증대 조건에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

## 적 요

토양으로부터 분리한 380개체의 균주 중 *Fusarium solani*에 대해 길항능력이 있는 방선균 및 세균 42개 균주로부터 길항작용이 큰 균주로 CHA 1과 S-PFHR 6을 공시하여 동정한 결과 각각 *Promicromonospora* sp.와 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*로 동정되었다.

PDA 평판배지상에서 두 균주는 모두 *F. solani*의 저해작용으로 균사의 길이 생장억제, 비정상적인 균사의 분지, 세포벽 분해에 의한 돌기형성 등이 관찰되었다. *F. solani* 포자발아에 미치는 길항균주의 배양여과액의 작용으로 감자즙액 배지나 nutrient broth에 배양한 여과액은 포자발아 억제력이 높아 14.3%의 낮은 발아율을 보였으며, 토양침출액 단독

또는 두 영양배지에 토양침출액을 첨가하여 준비한 배양 여과액에서의 발아율은 85% 이상으로 포자발아가 촉진되었으나 S-PFHR 6의 경우 두 영양배지에 소량의 토양침출액을 첨가한 배양여과액에서 4%의 발아율을 보였다. 자연토양에서 대형포자는 19.4%, 후막포자는 17.7%가 발아하였으나 증기살균 토양에서의 발아율은 79.7% 이상으로 증가하였다. 자연토양에 공시길항균 CHA 1과 S-PFHR 6의 균체를 처리하면 토양 정균력이 증가되어 *F. solani*의 대형포자 발아율은 각 처리구에서 각각 14.7%, 11.7%로 감소하였다. 길항균을 처리한 토양에 glucose와 asparagine을 처리하면 토양의 정균력이 점차 해소되어 대형포자의 발아율은 48.0% 이상으로 증가하였다.

공시균주의 2차 대사산물에 의한 길항작용으로 두 균주의 배양여과액을 토양에 처리한 경우 CHA 1의 배양여과액을 처리한 토양에서의 *F. solani* 대형포자의 발아율은 9.3%, S-PFHR 6 처리구에서의 발아율은 38.0%가 되었다. *F. solani*의 후막포자는 공시길항균주의 균체나 배양여과액 처리구에서의 발아율이 자연토양에서의 발아율보다 낮았으며 이러한 현상은 영양원을 첨가해 주어도 변하지 않았다.

## 사 사

본 연구는 92-93년도 한국과학재단의 목적기초연구비 지원(921-1500-054-2)에 의해 이루어졌으며 한국과학재단의 연구비 지원에 감사드립니다.

## 參考文獻

- Allen, O. N. 1957. Experiments in soil bacteriology, 3rd rev. ed. Burgess Publ. Co. Minneapolis, Minn.
- 安龍濤, 金鴻鎮, 吳承煥, 崔承允. 1982. 連作地 土壤에서 土壤燻蒸製 處理가 人蔘의 根腐, 赤腐 및 生育에 미치는 影響. *Korea J. Ginseng Sci.* 46-55.
- Barnett, H. L. 1963. The nature of mycoparasitism. *Ann. Rev. Microbiol.* 17: 1-14.
- Benson, H. J. 1990. Microbiological applications; A laboratory manual in general microbiology. Wm. C. Brown Publishers p. 60.
- Boosalis, M. G. 1964. Hyperparasitism. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 363-376.
- Brisbane, P. G. and Rovira, A. D. 1988. Mechanism

- of inhibition of *Gaeumannomyces* var. *tritici* by fluorescent Pseudomonads. *Plant Pathology* 37: 104-111.
- Buchanan, R. E. and Gibbon, N. E.(eds). 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th eds. Williams and Wilkins. Baltimore, U.S.A.
- Burr, T. J. and Caesar, A. 1984. Beneficial plant bacteria. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 2: 1-10.
- Choi, H. J. and Chung, H. S. 1971. Effects of fungicidal drenches on damping-off organisms in ginseng seed-bed and yields of seedling root. *Kor. J. Plant Protection.* 10: 7-12.
- Chung, H. S. and Kim, C. H. 1978. Biological control of ginseng root rots with soil amendments. Proc. 2nd Int. *Ginseng Symposium.* 67-74.
- Chung, Y. R., Chung, H. S. and Ohh, S. H. 1981. Antagonistic effects of *Streptomyces* species against *Fusarium solani* causing ginseng root rot (Abstract). *Kor. J. Mycol.* 9(3): 163.
- Davidson, J. 1988. Plant beneficial bacteria. *Biotechnology* 6: 282-286.
- Elad, Y. and Baker, R. 1985. The influence of trace amounts of cations and siderophore-producing Pseudomonads on chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology.* 75: 1047-1052.
- Elad, Y. and Chet, I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology.* 77: 190-195.
- Ferreira, J. H. S., Matthee, F. N. and Thomas, A. C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grape vine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81: 283-287.
- Filonow, A. B. and Lockwood, J. L. 1979. Conidial exudation by *Cochliobolus victoriae* on soils in relation to soil mycostasis. p 107-119.
- Filonow, A. B., Akueshi, C. O. and Lockwood, J. L. 1983. Decreased virulence of *Cochliobolus victoriae* conidia after incubation on soils or on leached sand. *Phytopathology* 73: 1632-1636.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillip, G. B. 1981. Manual of methods for general bacteriology. American society for microbiology. Washington, D.C. 20006.
- Gladders, P. 1976. Studies on *Rhizoctonia tuliparum* Whetzel and Arthur. Ph. O. Thesis. Univ. of Hull. England.
- Griffin, G. J. 1962. Production of fungistatic effect by soil microflora in autoclaved soil. *Phytopathology* 52: 90-91.
- Gross, D. C. 1985. Regulation of syringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and defined conditions for its production. *J. Appl. Bacteriol.* 58: 167-174.
- Heo, H, Hong I. P. and Lee, M. W. 1987. Quantitative evaluation of leaching model system for soil fungistasis. *Kor. J. Mycol.* 15(4): 254-259.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluterin. *Phytopathology* 70: 712-715.
- Hsu, S. C. and Lockwood, J. L. 1973. Soil fungistasis, behavior of nutrient independent spores and sclerotia in a model system. *Phytopathology.* 63: 334-337.
- Kim, J. H. and Lee, M. W. 1974. Study on the root rot of ginseng(I). *Kor. J. Microbiol.* 12: 94-98.
- Kim, S. I., Shim, J. O. Choi, H. J. and Lee, M. W. 1992. Suppressive mechanisms of soil-borne disease development and practical application. *Korea J. Mycol.* 20: 337-346.
- King, E. O, Ward, M. K. and Rarey, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of Pyocyanin and fluorescin. *J. Lab Clin. Med.* 44: 301-3070.
- Kloepper, J. W. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant-growth promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia cartovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathology* 73: 217-219.
- Ko, W. H. and Lockwood, J. L. 1967. Soil fungistasis; relation to fungal spore germination. *Phytopathology* 57: 894-901.
- Lee, M. W., Choi, H. J. and Shim, J. O. 1985. Spore germination of some plant pathogenic fungi under different soil conditions in relation to soil fungistasis. *Kor. J. Plant pathol.* 1(3): 157-164.
- Lifshitz, R., Windham, M. T., and Baker. R. 1986. Mechanism of biological control of preemergencing damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 720-725.
- Lingapa, B. T. and Lockwood, J. L. 1964. Activation of soil microflora by fungus spores in relation to soil fungistasis. *J. Gen. Microbiol.* 35: 215-227.
- Lockwood, J. L. 1975. Quantitative evaluation of a leaching model system for soil fungistasis. *Phytopathology.* 65: 460-464.
- Lockwood, J. L. 1977. Fungistasis in soil. *Biol. Rev.* 52: 1-43.
- McKeen, C. D., Reilly, C. C., and Pusey, P. L. 1986.

- Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* **76**: 136-139.
- Morgan, F. L. 1963. Infection inhibition and germ tube lysis of three cereal rusts by *Bacillus pumilus*. *Phytopathology* **53**: 1346-1348.
- Oedjijono, Line, M. A. and Dragar, C. 1993. Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* **25**(2): 247-250.
- Papavizas, G. C. 1975. Crop residues and amendments in relation to survival and control of root-infecting fungi(introduction). p 76. Biology and control of soil borne plant pathogens; G. W. Bruehl, ed APS. St Paul M. N. 216pp.
- Parker, W. L., Rathrum, M. L., Senier, V., Trejo, W. H., Principe, P. A. and Sykes, R. B. 1984. Cepacin A and Cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *The journal of Antibiotics*. **37**: 431-440.
- 심재욱, 1989. 인삼근부병원 진균의 발병억제 및 유발 토양의 특성과 방제에 관한 연구. 동국대 대학원 박사학위논문. p 83.
- Schroth, M. N., Loper, J. E. and Hildebrand, D. C. 1984. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. Pages 362-369: Current perspective in microbial ecology. M. J. Klug and C. A. Reddy, eds. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Sneh, B. and Lockwood, J. L. 1986. Quantitative evaluation of the microbial nutrient sink in soil in relation to a model system for soil fungistasis. *Soil Biol. and Biochem.* **8**: 65-69.
- Sneh, B., Humble, S. J. and Lockwood, L. 1977. Parasitism of oospores of *Phytophthora megasperma* var. *Sojae*, *P. cactorum*, *Pythium spp.* and *Aphanomyces euteichesin* in soil by Oomycetes, Chytridiomycetes, Hyphomycetes, Actinomycetes and Bacteria. *Phytopathology* **67**: 622-628.
- Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y. and Baker, R. 1984. Chlamydospores germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium* suppressive soil. *Phytopathology* **74**: 1115-1124.
- Son, S. G., Shin, H. S., and Lee, M. W. 1975. Effects of ammendment on ginseng root rot caused by *F. solani* population changes of the microorganisms in soil. *Kor. J. Mycol.* **13**(1): 41-47.
- Thomashow, L. S., Weller, D. H., Bonsall, R. F. and Pierson, L. S. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizoplane of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 908-912.
- Unnamalai, N. and Gnanamanickan, S. S. 1984. *Pseudomonas fluorescens* is an antagonist to *Xantomonas citri*(Hasse) Dye, The incident of citrus canker. *Currrent Science* **53**: 703-404.
- Vidaver, A. K., Mathys, M. L., Thomas, M. E. and Schuster, M. L. 1972. Bacteriocins of phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. *Can. J. Microbiol.* **18**: 705-713.
- Whetzel, H. H. and Rosenbaum, J. 1912. The disease of ginseng and their control. U.S.A. *Plant Indus. Bur. Bul.* **250**: 17-19.
- Whetzel, H. H., Rosenbaum, J., Brann, J. W. and McClintock, J. A. 1916. Ginseng diseases and their control. U.S.D.A. Farmer's Bul. **736**: 1-23.
- Wiley, W. R. and Stokes, J. L. 1962. Requirement of an alkaline pH and ammonia for substrate oxidation by *Bacillus pasteurii*. *J. Bacteriology.* **84**: 730-734.
- Xu, G. W. and Gross, D. C. 1986. Field evaluation of the interactions among fluorescent pseudoinons, *Erwinia carotovora* in potato fields. *Phytopathology.* **71**: 523-443.
- Yu, Y. H. 1987. Root rot diseases of *Panax ginseng* and their control in Korea.(abstract). *Kor. J. Plant Pathol.* **3**(4): 318-319.
- 柳寅鉉, 吳承煥. 1985. 人蔘疫病에 對한 Metalaxyl의 防除效果. *Korean J. Ginseng Sci.* **9**(2): 163-169.